

JURNAL

**PENGUNAAN METODE *MOLECULAR SEXING* UNTUK PENENTUAN
JENIS KELAMIN BURUNG JALAK BALI (*Leucopsar rothschildi*)**

Disusun oleh:

Putu Indra Pramana Wirastika

NPM : 080801055



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA**

2013

**Penggunaan Metode *Molecular Sexing* untuk Penentuan Jenis Kelamin
Burung Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*)
Sex Determination of Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*) using Molecular
Sexing**

Putu Indra Pramana Wirastika¹, Ignatius Pramana Yuda², Felicia Zahida³
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta,
Nd_ra_21@yahoo.com

Abstrak

Penentuan jenis kelamin burung sejak anakan diperlukan untuk kepentingan konservasi. Burung Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*) yang pada usia anakan bersifat monomorfik sulit untuk dibedakan secara morfologi antara jantan dan betina, namun setelah dewasa bersifat dimorfik. Pendekatan molekuler (*molecular sexing*) menjawab permasalahan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan molekul primer yang paling efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali. Metode yang digunakan adalah teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan tiga pasang primer spesifik yaitu primer P2/P8, primer 2550F/2718R dan primer 1237L/1272H, yang mengamplifikasi gen CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*). Sampel DNA diperoleh dari 30 ekor bulu muda pada bagian sayap burung Jalak Bali. Bulu yang diperoleh merupakan bulu sayap sekunder dari burung Jalak Bali yang mengalami fase molting dengan skor 2. Metode ekstraksi DNA yang digunakan adalah metode *phenol chloroform extraction*. Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR menunjukkan bahwa ketiga primer bisa mengidentifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali dengan tingkat keberhasilan yang berbeda. Berdasarkan jumlah sampel yang teramplifikasi, maka primer P2/P8 paling baik jika dibandingkan dengan primer lainnya. Tingkat keberhasilannya mencapai 90%. Sementara itu tingkat keberhasilan primer lainnya adalah 86,7% (2550F/2718R), dan 73,3% (1237L/1272H).

Kata Kunci : Jalak Bali, *Molecular Sexing*, CHD, Primer P2/P8, Primer 2550F/2718R, Primer 1237L/1272H

Pendahuluan

Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*) adalah satwa endemik Pulau Bali yang sekarang penyebarannya terbatas hanya di Taman Nasional Bali Barat (TNBB) dan sekitarnya. Burung ini dikategorikan sebagai jenis burung yang terancam punah karena populasinya yang sangat kecil di alam. Dalam *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) status Jalak Bali *Critically Endangered* dan

termasuk dalam *Appendix I Convention on International Trade in Endangered Species (CITES)* (BirdLife International, 2001). Salah satu upaya yang telah dilakukan TNBB dalam menjaga maupun mempertahankan keberadaan jenis Jalak Bali adalah program Penangkaran Jalak Bali di Tegal Bunder.

Penangkaran satwa liar dapat dikatakan berhasil apabila teknologi jenis satwa tersebut telah dikuasai, artinya penangkaran telah berhasil mengembangbiakkan jenis satwa yang ditangkarkan dan satwa hasil penangkaran tersebut berhasil bereproduksi di alam bebas dan penangkaran harus juga dihindarkan dari *inbreeding*.

Burung Jalak Bali tergolong burung monomorfik, antara jantan dan betina memiliki ciri morfologi yang hampir sama apalagi saat usia muda/anakan, sehingga sulit dibedakan. Kemiripan tersebutlah yang menjadi kendala awal untuk memasangkan individu Jalak Bali pada saat upaya penangkaran akan dilakukan. Untuk mengatasi masalah tersebut, beberapa penelitian tentang perbedaan antara jantan dan betina telah banyak dilakukan di penangkaran baik yang berdasar pada morfologi, karakteristik dan perilaku burung Jalak Bali (Anonim, 2009).

Penentuan jenis kelamin burung sangat penting karena hal ini merupakan salah satu kunci keberhasilan upaya penangkaran burung jalak bali. Beberapa metode penentuan jenis kelamin telah ditemukan seperti *vent sexing*, *laparoscopi*, *sexing steroid* dan *karyotyping*. Metode-metode ini sering digunakan untuk menentukan jenis kelamin yang dimiliki oleh burung monomorfik. Namun metode ini memakan waktu yang lama dan mahal. Beberapa dari metode tersebut dapat menyakitkan dan bahkan mengakibatkan kematian pada burung (Dubeic dan Zagalska-Neubauer, 2005).

Bahan dan Metode

A. Alat dan Bahan

Pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Februari 2012. Sedangkan analisis *molecular* dikerjakan pada bulan Februari 2012 - Januari 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung ependorf, *tube stand*, timbangan, *microtube*, *centrifuge*, *tip*, *microwave*, *freezer*, *waterbath*, *vortex*, *spin down*, sendok kimia, *gel tray*, *comb*, bak elektroforesis, *gel doc*, *thermocycler*, *glove*, masker, gelas beker, gelas ukur, pinset, gunting.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Queens lysis buffer* (0,01M Tris-Cl; 0,01M NaCl; 0.01M EDTA 1% *n-lauroylsarcosine*), *lysis buffer* (50 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM *ethylenediaminetetraacetic* [EDTA], 2% *sodium dodecylsulfate* [SDS]); *proteinase K*; *reaction buffer* (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9; 0,1% Triton X-100) 50 mM MgCl₂; 2 mM dNTP; 100 ng untuk masing-masing primer; 2,5 unit *Taq*; 50-250 ng genomik DNA; buffer elektroforesis; *blue juice loading dye*; *goldview*; *agarose gel* 3%; DNA *ladder*; *double destilate H₂O* (*ddH₂O*), satu helai sampel bulu burung Jalak Bali.

B. Metode

Metode yang digunakan meliputi, pengambilan sampel bulu, isolasi DNA, dan PCR

a. Pengambilan Sumber DNA

Bulu muda yang ada pada bagian sayap dicabut dengan pinset hingga akarnya. Tiap sampel bulu disimpan dalam amplop yang berbeda dan diberi label atau nomor sampel. Sampel bulu burung Jalak Bali yang telah didapat

kemudian diawetkan dalam tabung ependorf 1,5 ml yang sudah diisi dengan *Queen's Lysis buffer* hingga tenggelam kemudian disimpan dalam suhu ruang atau *freezer*.

b. Isolasi DNA

Bagian terminal bulu burung dipotong 0,5-1cm, dimasukkan dalam tabung ependorf yang mengandung 500 μ l *lysis buffer* (50 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM *ethylenediaminetetraacetic* [EDTA], 2% *sodiumdodecylsulfate* [SDS]) dan *proteinase K* dengan total konsistensi 175 mg/ml. Sampel kemudian diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam suhu dinaikkan menjadi 50°C selama 1 jam. Setelah mengalami proses *lysis*, sample disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit dan supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke tabung ependorf yang baru untuk tahap purifikasi DNA. Purifikasi DNA menggunakan protokol *phenol chloroform isoamylalkohol* (PCI) dengan perbandingan 25:24:1 (Bello, 2001).

Purifikasi PCI dilakukan dengan menambahkan *Phenol-Chloroform-Isoamyl* sebanyak 700 μ l setelah itu dikocok selama 30 detik dan diletakkan dalam kotak es selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimal (13000 rpm) selama 5 menit. Bagian supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Supernatan ditambahkan *Chloroform-Isoamyl* sebanyak 600 μ l, kemudian dikocok selama 30 detik dan diletakkan dalam kotak es selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimal (13000 rpm) selama 3 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Setelah supernatan dimasukkan ke dalam *microtube* baru kemudian ditambahkan ethanol absolute 95% sebanyak dua kali volume

supernatan (750 µl) dan NaCl sebanyak 25 µl kemudian diinkubasi dalam *freezer* selama 15 menit, setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 13000 rpm dengan suhu 4°C selama 30 menit. Setelah sampel disentrifugasi, supernatan dibuang dan ditambahkan ethanol 70% sebanyak 500

µl, kemudian diinkubasi dalam *freezer* selama 15 menit, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan *microtube* dikeringkan hingga tidak ada lagi ethanol yang tersisa. Setelah tidak ada ethanol yang tersisa *microtube* ditambahkan *double destilated H₂O* sebanyak 25 µl, kemudian pelet DNA diresuspensi

Setelah itu hasil isolasi dilakukan uji kualitas DNA dengan melakukan proses elektroforesis dengan Agarose 0,8%, Tegangan 100 Volt dengan waktu 20 menit.

c. PCR

PCR dilakukan dengan membuat campuran reagen dan kondisi serta siklus PCR sebagai berikut:

Tabel 1. Reagen (*Vivantis DNA Amplification kit*) yang digunakan dalam proses amplifikasi primer 1237L/1272H dan 2550F/2718R.

Reagen	Primer 2550F/2718R		Primer 1237L/1272H	
	Volume	Final Concentration	Volume	Final Concentration
ddH ₂ O	15,3µl	-	15,3µl	-
10x Buffer	2,5µl	1X	2,5µl	1X
50 mM MgCl	1µl	1,5mM	1µl	1,5mM
2mM dNTPS	2,5µl	0,2mM	2,5µl	0,2mM
10µl primer F	1µl	0,2mM	1µl	0,2mM
10µl primer R	1µl	0,2mM	1µl	0,2mM
DNA tamplate	1µl	1µl	1µl	1µl
5 µ/µl <i>Taq pol</i>	0,2 µl	2 U	0,2 µl	2 U
BSA	0,5µl	-	0,5µl	-
Total reaksi	25µl		25µl	

Tabel 2. Reagen (*Vivantis DNA Amplification kit*) yang digunakan dalam proses amplifikasi primer P2/P8

Reagen	Primer P2/P8	
	Volume	Final Concentration
ddH ₂ O	13,7µl	-
10x Buffer	2,5µl	1X
50 mM MgCl	1µl	1,5mM
2mM dNTPS	2,5µl	0,2mM
10µl primer F	1,5µl	0,3mM
10µl primer R	1,5µl	0,3mM
DNA tamplate	1,5µl	1,5µl
5 µ/µl <i>Taq pol</i>	0,3 µl	3 U
BSA	0,5µl	-
Total reaksi	25µl	

Tabel 3. Tahapan dalam Program PCR pada primer P2/P8, 1237L/1272H dan 2550F/2718R.

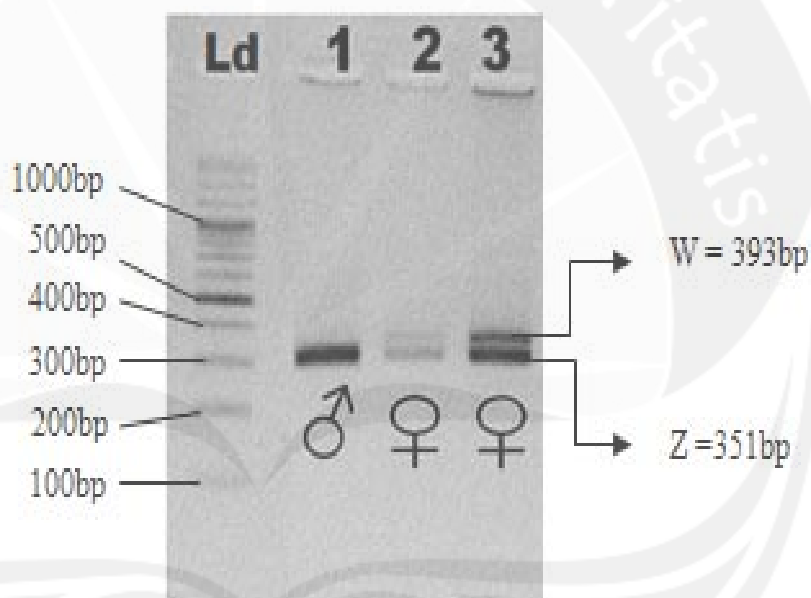
Tahapan	Primer P2/P8		Primer 2550F/2718R		Primer 1237L/1272H	
	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)
Tahap I	94	300	95	300	92	120
	94	30	95	30	92	30
Tahap 2	48	45	42	40	57	45
	72	30	72	30	72	45
Tahap 3	72	300	72	300	72	300
Siklus	40 siklus		35 siklus		30 siklus	

Setelah dilakukan proses PCR dilanjutkan dengan proses elektroforesis menggunakan Agarose 3%, Tegangan 100 Volt dengan waktu 30 menit.

Hasil dan Pembahasan

Data yang didapatkan dari hasil penelitian tiga (3) pasang primer dengan metode molekuler diperoleh hasil sebagai berikut. Pada proses amplifikasi DNA burung jalak bali yang berjumlah 30 sampel DNA dari individu yang berbeda menggunakan primer P2/P8, 27 dari 30 sampel DNA yang diamplifikasi menunjukkan hasil positif karena pada proses visualisasi muncul pola pita yang menunjukkan jantan dan betina. Visualisasi dari hasil PCR primer P2/P8 menggunakan gel agarose konsentrasi 3% dengan tegangan 100 volt selama 30

menit menghasilkan dua untaian pola pita DNA yang terpisah dengan jarak kromosom W dan Z yang saling berdekatan, walaupun jarak antara kromosom W dan Z saling berdekatan tetapi masih dapat membedakan individu jantan dan betina dengan baik (Gambar 1). Ukuran kromosom W dan Z yang terlihat dari proses elektroforesis dihitung menggunakan grafik eksponensial, didapat ukuran amplikon dari kromosom W = 393 bp dan kromosom Z = 351 bp (Gambar 1). Ukuran yang didapat dari perhitungan menunjukkan kesesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Griffiths dkk., 1998.



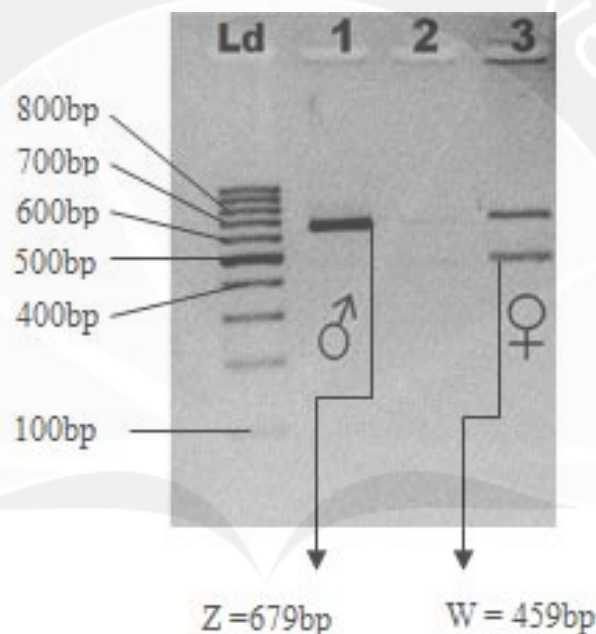
Gambar 1. Hasil Visualisasi PCR Primer P2/P8

Dari 27 sampel DNA Jalak Bali yang berhasil diampifikasi 12 diantaranya teridentifikasi sebagai betina sedangkan 15 lainnya teridentifikasi sebagai jantan. Rasio keberhasilan dari PCR menggunakan primer P2/P8 adalah 90%

Primer 2550F/2718R dari 30 sampel individu burung Jalak Bali yang teridentifikasi hanya 26 sampel menunjukkan hasil positif yang terdiri dari 16 individu jantan dan 10 individu betina, sedangkan 4 diantaranya tidak dapat diampifikasi dengan ditunjukkan tidak adanya pita DNA yang dihasilkan pada

proses visualisasi DNA yang dilakukan dalam gel agarose 3% dengan tegangan 100 volt dengan lama waktu 30 menit. Primer 2550F/2718R, jantan teridentifikasi dengan pola satu pita yang memiliki panjang, sedangkan betina teridentifikasi dengan pola dua pita.

Pita pertama hasil amplifikasi primer 2550F/2718R merupakan kromosom W memiliki panjang 679 bp dan pita kedua merupakan kromosom Z memiliki panjang 459 bp (Gambar 2).

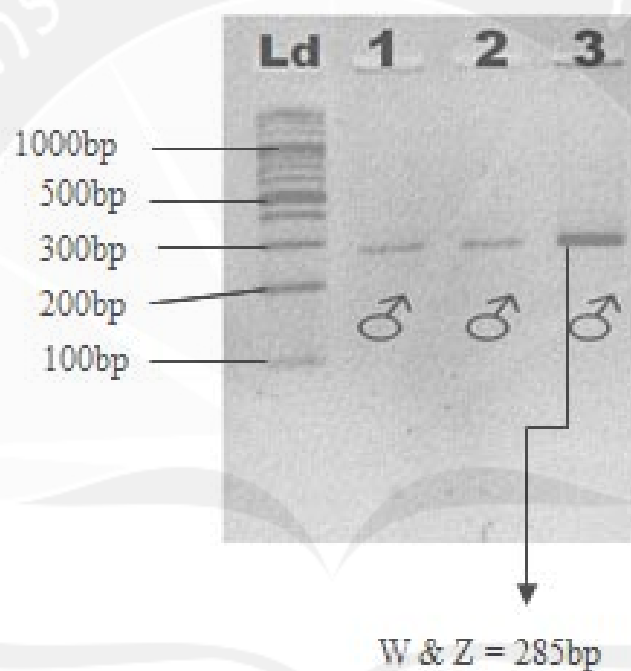


Gambar 2. Hasil Visualisasi PCR Primer 2550F/2718R

Ukuran dari kromosom W dan Z hasil amplifikasi Primer 2550F/2718R dihitung dengan grafik eksponensial. Rasio keberhasilan dari pasangan primer 2550F/2718R dalam mengamplifikasi DNA burung Jalak Bali mencapai 86,7%.

Primer 1237L dan 1272H dari 30 sampel individu burung Jalak Bali yang teridentifikasi hanya 22 sampel yang menunjukkan hasil positif terdiri 22 jantan (terbentuk satu pita saat proses visualisasi) tanpa ada yang teridentifikasi individu betina, yang divisualisasi pada gel agarose 3% dan diberi tegangan 100 volt selama 30 menit.

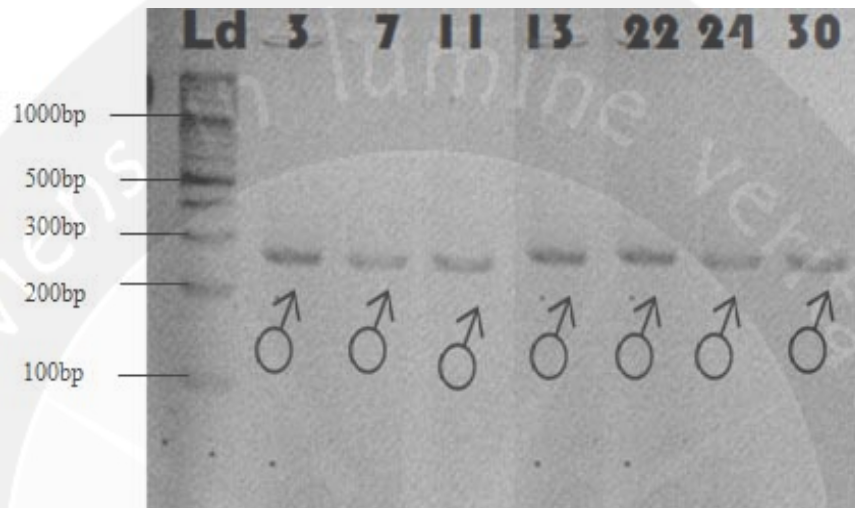
Rasio keberhasilan proses amplifikasi mencapai 73,3% karena dari 30 sampel DNA yang digunakan, DNA yang teramplifikasi dengan baik hanya 22 sampel, sedangkan 8 diantaranya tidak dapat teramplifikasi. Primer 1237L/1272H hanya menghasilkan pola satu pita pada individu jantan dan betina dengan ukuran panjang 285 bp (Gambar 3), sehingga terjadi perbedaan hasil amplifikasi dari primer 1237L/1272H dengan kedua pasang primer 2550F/2718R dan primer P2/P8 (Gambar 1 dan 2).



Gambar 3. Hasil Visualisasi PCR Primer 2550F/2718R

Pola satu pita yang dihasilkan oleh primer 1237L dan 1272H pada 22 sampel proses amplifikasi memiliki ketebalan pita yang berbeda pada setiap sampelnya. Perbedaan ketebalan pita yang dimiliki terlihat pada sampel nomer 3, 7, 11, 13, 22, 24 dan 30 mengindikasikan bahwa antara kromosom W dan Z belum terpisahkan secara baik, jika dibandingkan dengan hasil identifikasi primer P2/P8 dan 2550/2718 yang menghasilkan dua pola pita memperkuat dugaan bahwa kromosom W dan Z belum terpisah secara baik. Jadi untuk memastikan hal

tersebut sampel nomer 3, 7, 11, 13, 22, 24 dan 30 dilakukan visualisasi ulang dengan menaikkan konsentrasi gel, tegangan, dan waktu pada saat proses elektroforesis. Proses visualisai pada awalnya menggunakan gel agarose 3% yang diberi tegangan 100 volt selama 30 menit dirubah menjadi agarose 4% yang diberi tegangan 100 volt selama 70 menit.



Gambar 4. Hasil Visualisasi Ulang PCR Primer 1237L/1272H (*Leucopsar rothschildi*)

Hasil dari visualisasinya primer 1237L dan 1272H menunjukan hasil yang positif pada proses amplifikasinya, akan tetapi primer 1237L dan 1272H tidak dapat mengidentifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali karena pada saat proses visualisasi hanya menghasilkan satu untai pita walaupun konsentrasi gel, tegangan, dan waktu pada saat proses elektroforesis sudah dinaikkan (Gambar 4).

Menurut Shizuka dan Lyon (2008), produk PCR yang dihasilkan oleh primer 1237L dan 1272H adalah 2 untai pita yaitu CHD-W dan CHD-Z. Karena ukuran intron dari produk PCR yang dihasilkan sama maka tidak dapat dipisahkan dalam gel agarose 3%.

Data yang diperoleh dari penelitian memiliki beberapa perbedaan hasil yang didapat ketika membandingkan antara hasil identifikasi secara molekuler

dengan hasil identifikasi secara morfologi seperti yang ditunjukkan pada sampel 1, 2, 3, 9, 10 dan 21 pada primer P2/P8. Sedangkan pada primer 2550F/2718R perbedaan ditunjukkan pada sampel 1, 3, 9, 10 dan 21. Hal ini membuktikan bahwa identifikasi yang dilakukan secara morfologi pada anakan dapat mengalami kesalahan walaupun dilakukan oleh orang yang sudah ahli sekalipun, ini ditunjukkan pada sampel nomor 1, 2 dan 9, oleh sebab itu perlu teknik PCR untuk mendapatkan hasil yang akurat terutama pada burung Jalak Bali saat usia anakan.

Berdasarkan penelitian identifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali dengan cara membandingkan metode secara molekuler dengan metode identifikasi secara morfologi hasilnya menunjukkan bahwa primer 2550F/2718R (Fridolfsson dan Ellegren, 1999) dan P2/P8 (Griffiths dkk., 1998) lebih baik digunakan untuk sexing burung jalak bali jika dibandingkan dengan primer 1237L/1272H (Khan dkk., 1998), karena hasil yang didapat pada proses visualisasi amplifikasi DNA sesuai apabila dibandingkan dengan identifikasi menggunakan ciri morfologi walaupun terdapat perbedaan rasio dalam keberhasilan proses amplifikasi.

Simpulan

1. Dari 30 sampel individu burung Jalak Bali yang teridentifikasi primer P2/P8 hanya 27 sampel yang menunjukkan hasil positif yang terdiri dari 15 individu jantan dan 12 individu betina dengan rasio keberhasilan PCR sebesar 90%. Primer 2550F/2718R hanya 26 sampel yang menunjukkan hasil positif yang terdiri dari 16 individu jantan dan 10 individu betina dengan rasio keberhasilan sebesar 86,7%. Primer 1237L/1272H hanya 22 sampel yang menunjukkan hasil positif yang terdiri 22 jantan tanpa ada individu betina dengan rasio keberhasilan 73,3%.

2. Pasangan primer P2/P8 dan Primer 2550F/2718R merupakan pasangan primer yang paling baik digunakan untuk mengidentifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali

Saran

Saran yang perlu diberikan setelah melihat hasil penelitian ini adalah untuk mengetahui kuantitas DNA hasil ekstraksi diperlukan penggunaan spektrofotometer agar hasil amplifikasi yang didapat mencapai 100%. Selain itu untuk mempermudah peneliti dalam memperoleh DNA hasil ekstraksi disarankan menggunakan *extraction kit* dibandingkan menggunakan metode PCE, sebab metode PCE akan agak sulit dilakukan dalam mengekstraksi bulu muda yang digunakan sebagai sumber material DNA karena metode PCE memerlukan proses ekstraksi yang berulang-ulang dan berakibat terhadap lamanya proses penelitian.

Ucapan terimakasih

Saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada pihak Taman Nasional Bali Barat yang telah memberikan izin untuk melakukan pengambilan sampel dan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Anonim, 2009. *Jalak Bali di Bali Barat*. Departemen Kehutanan. Laporan Tahunan Balai Taman Nasional Bali Barat. Tidak diterbitkan.
- BirdLife International. 2001. *Threatened birds of Asia: the BirdLife International Red Data Book*. BirdLife International, Cambridge, U.K.
- Dubiec, A. dan Zagalska-Neubauer M. 2005. Molecular Techniques For Sex Identification In Birds. Department Of Ornithology, Polish Academy Of Sciences, Nadwi.Lañska 108, 80-680 Gdańsk, Poland. *Biological Letters* 2006 43(1): 3.12.

Fridolfsson, A-K dan Ellegren, H. 1999. A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30: 116-121

Griffiths, R., Double, M.C., Orr K., Dawson, R.J.G. 1998. A DNA Test to Sex Most Birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.

Kahn N. W., John J. S., Quinn T. W. 1998. Chromosome-specific Intron size Differences in The Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *Journal of the American Ornithologists Union* 15: 1074-1078.

